

Participação da Proteína ADAM23 no Desenvolvimento Neural

Lianara Teresinha Mumbach Brandenburg^{1*}

Introdução

A maioria das células encontradas no sistema nervoso central maduro origina-se de um neuroepitélio inicial. Estas células sofrem numerosas divisões mitóticas antes de amadurecerem e emitirem processos axonais e dendríticos para fazerem conexões com outros neurônios ou órgãos terminais [1].

O funcionamento do sistema nervoso é possível graças a duas propriedades cerebrais que estão muito desenvolvidas nos neurônios: a irritabilidade, pela qual os neurônios captam com facilidade os estímulos que recebem, e a condutibilidade, que faz com que os efeitos destes estímulos viajem rapidamente através do corpo neuronal e seus prolongamentos [2].

Sugere-se que o crescimento axonal é feito através de uma rota de sinais quimioatraentes e quimiorepelentes produzidos por células do sistema nervoso, bem como moléculas da matriz extracelular. Neste mecanismo estão envolvidos receptores específicos presentes no cone de crescimento que detectam o caminho e desenvolvem uma resposta axonal direta [3].

A adesão célula-célula e célula-matriz extracelular são processos vitais para o desenvolvimento neural. Recentemente, foi descrita uma nova família de moléculas de adesão, as desintegrinas celulares – ADAMs (*A Desintegrin And Metalloproteinase Domains*). Estas são as únicas moléculas, entre proteínas de superfície celular que apresentam na mesma molécula domínios estruturais protéicos responsáveis por adesão e proteólise [1,4].

Em doenças neurodegenerativas, a célula neuronal doente usualmente sofre influências da ativação de células gliais, astrócitos e micróglia. Ativação da glia envolve remodelação e sinalização da matriz extracelular e adesão celular por meio de “shedding” de citocinas, receptores de citocinas e fatores de crescimento. Proteínas da matriz extracelular (MMPs e ADAMs) são também capazes de atuar nestas funções [5].

A comunicação mediada por proteínas de adesão entre células individualizadas e entre células e matriz extracelular, bem como o processo de proteólise e remodelação de proteínas celulares e extracelulares, são essenciais para a manutenção da estrutura e função do sistema nervoso central (SNC). Portanto, as proteínas ADAMs medeiam interações adesivas e proteólise, bem como possuem implicações essenciais no desenvolvimento neural [6].

Estudos condizentes à família das desintegrinas caracterizam um novo membro denominado de ADAM23/ MDC3, predominantemente expressa tanto em cérebro adulto quanto fetal, sugerindo que a mesma possa influenciar diferentes estágios de desenvolvimento e manutenção da estrutura e funções neurais, aspectos potencialmente relevantes em neurobiologia [7]. Devido a sua pouca descrição neste aspecto biológico, procurou-se avaliar a expressão diferencial da desintegrina ADAM23 em diferentes estágios de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), empregando-se a técnica de Western Blotting. ADAM23 mostrou-se altamente expressa em amostras cerebrais de camundongos recém-nascidos (P6) quando comparados a animais adultos.

Material e Métodos

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizadas duas metodologias:

A. Preparação de frações protéicas a partir de precipitação sequencial com sulfato de amônio

Com este método, foi obtido extrato protéico total após homogeneização de cérebros e cerebelos de camundongos Swiss adultos e recém-natos em tampão Tris-HCl pH 7.4, acrescido de inibidores de protease. O material foi submetido a precipitações sucessivas de 15%, 25%, 35%, 45% e 55% com sulfato de amônio saturado. Amostras protéicas foram dialisadas contra PBS 1X, mensuradas através do método de Bradford [8], aliqüotadas e armazenadas a -20°C.

B. Reação de Western Blotting

As proteínas obtidas pelo método de precipitação sequencial de amostras do SNC com sulfato de amônio saturado foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 6% e 7,5% contendo SDS, em seguida transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose (0,45 µm). Estas foram incubadas com anticorpo primário (anti-peptídeo ADAM23 humana), seguido da incubação com anticorpo secundário apropriado, com posterior revelação do material (reação quimioluminescente).

Resultados e Discussão

Na tentativa de conseguir amostras protéicas enriquecidas em ADAM23, procurou-se estabelecer um protocolo para a purificação desta molécula a partir de

1. Professor Colaborador. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Rua Universitário, 2069, Cascavel, PR, CEP 85819-110.

* Autor para contato: E-mail: lianarab@uol.com.br

extratos de cérebro e cerebelo de camundongos. Desta forma, optou-se pela técnica de precipitação protéica seqüencial com sulfato de amônio saturado. Analisando-se a Fig. 1, pode-se observar que o antígeno ADAM23 está presente na fração 25% de amostras cerebrais adultas, após incubação com anticorpo anti-peptídeo ADAM23 humana (diluição 1:500). Esta técnica (Western Blotting) comprova que amostras obtidas por preparação de frações protéicas estão mais enriquecidas com antígeno de interesse do que o extrato total (E.T.), fato que corrobora com a literatura, uma vez que a desintegrina ADAM23 possui massa molecular em torno de 97kDa [9].

No intuito de melhor investigar a expressão da ADAM23 durante o desenvolvimento e maturação do SNC procurou-se avaliar a presença desta proteína no cérebro de camundongos com seis dias de desenvolvimento pós-natal (P6). Como pode ser observado na Fig. 2, o anticorpo anti-peptídeo ADAM23 humana (na diluição 1:500) se liga tanto no cérebro de camundongos recém-natos (P6) como no de adultos. Interessantemente a reação parece ser mais intensa no antígeno apresentado nos cérebros de recém-natos utilizando-se a mesma concentração protéica (600µg/ por canaleta). Tal achado sugere que ADAM23 possa estar envolvida na maturação e desenvolvimento do sistema nervoso, assim como citado pela literatura [7,10].

Todas as ADAMs mostram um domínio de organização comum e com quatro funções potenciais: pteólise, adesão, sinalização e fusão [11,12].

Algumas ADAMs possuem expressão generalizada como a ADAM9/ ADAM10/ ADAM15 e ADAM17, já muitas outras ADAMs tem mostrado expressão tecidual específica: ADAM12 e ADAM19 no músculo, ADAM22 no cérebro e ADAM23 no cérebro e coração [13,14,15,16]. O largo grupo das ADAMs (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29 e 30) são predominantemente expressas em testículos e assim envolvidas na fertilização e espermatogênese [17].

Distribuição regional da expressão de mRNA de ADAMs no sistema nervoso central de camundongos difere consideravelmente. Enquanto a ADAM10, é expressa no cérebro humano adulto principalmente no tálamo, a ADAM11 é expressa no sistema nervoso central humano nas regiões do hipocampo, tálamo, medula espinhal e córtex cerebral. A ADAM23 é expressa também nestas regiões, mas sendo mais precisa no córtex cerebral e tálamo. Isto mostra que algumas ADAMs possuem distribuição ubíqua no sistema nervoso central enquanto outras possuem um padrão de expressão restrito [6,16].

Essencialmente, o domínio desintegrina da ADAM23 tem sido mostrado como envolvido na adesão de neuroblastomas através da interação com a integrina $\alpha_v\beta_3$ [7]. Desta forma, ADAM23 provavelmente é considerada como molécula mediadora de funções biológicas por agir como receptor de proteínas de superfície celular, as integrinas. Isto leva a desencadear entre as associações celulares, cascatas de sinalização intracelular [10].

Complementando evidências anteriores, a respeito da participação da ADAM23 no desenvolvimento neural e controle de suas funções, evidencia-se que a não expressão desta molécula em camundongos, desencadeia inúmeras alterações fisiológicas neurais como malformações, causando severa ataxia, tremores e morte dos animais em poucos dias [9].

Marcadamente ADAM23 é amplamente expressa no cérebro de camundongos e pode ser detectada particularmente em regiões específicas, como o hipocampo. Já no cerebelo sua expressão concentra-se nas células de Purkinje [4,10,18,19] e na camada granular, tendo ausência de expressão na camada molecular [18,10].

Os resultados obtidos no presente estudo do mapeamento temporal da proteína ADAM23, revelam inicialmente que a desintegrina ADAM23 precipita na fração 25% pela técnica de precipitação protéica seqüencial com sulfato de amônio saturado $[(NH_4)_2SO_4]$. Através de ensaios bioquímicos (Western Blotting) evidenciou-se que esta desintegrina apresenta uma expressão mais acentuada no SNC de animais recém-natos quando comparados com o de adultos, sugerindo papel relevante desta molécula na maturação do sistema nervoso. Desta forma pode-se concluir que há um decréscimo da expressão de ADAM23 no sistema nervoso de camundongos conforme há evolução na maturação deste sistema.

Agradecimentos

A todos que colaboraram com a realização deste trabalho, em especial ao Prof^o Dr. Silvio Marques Zanata da Universidade Federal do Paraná – UFPR, pelo incentivo e dedicação.

Referências

- [1] SMITH, K.M.; GAULTIER, A.; COUSIN, H.; ALFANDARI, D.; WHITE, J.M. & De SIMONE, D.W. 2002. The Cysteine-Rich Domain Regulates ADAM Protease Function in vivo. *The Journal of Cell Biology* 159: 893-902.
- [2] HIB, J. 2003. *Di Fiori – Histologia – Texto e Atlas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 486 p.
- [3] ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S. C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. 1999. *Fundamental Neuroscience*. San Diego, Califórnia, Academic Press. 752p.
- [4] NOVAK, U. 2004. ADAM proteins in the brain. *Journal of Clinical Neuroscience* 11: 227-235.
- [5] SCHLOMANN, U.; RATHKE-HARTLIEN, S.; YAMAMOTO, S.; JOCKUSCH, H.; BARTSCH, J.W. 2000. Tumor Necrosis Factor α induces a Metalloprotease-Disintegrin, ADAM8 (CD156): Implications for Neuron-Glia Interactions during Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience* 21: 7964-7971.
- [6] KÄRKKÄINEN, L.; RYBNIKOVA, E.; PELTO-HUIKKO, M.; HUOVILA, A. P. 2000. Metalloprotease-Disintegrin (ADAM) Genes are Widely and Differentially Expressed in the Adult CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15: 547-560.
- [7] CAL, S.; FREIJE, J.M.P.; LÓPEZ, J.M.; TAKADA, Y. & LÓPEZ-OTÍN, C. 2000. ADAM23/ MDC3, a Human Disintegrin that Promotes Cell Adhesion via Interaction with the $\alpha_v\beta_3$ Integrin through an RGD-independent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell* 11: 1457-1469.
- [8] BRADFORD, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

- [9] MITCHELL, K.J.; PINSON, K.I.; KELLY, O.G.K.; BRENNAN, J.; ZUPICICH, J.; SCHERZ, P.; LEIGHTON, P.A.; GOODRICH, L.V.; LU, X.; AVERY, B.J.; TATE, P.; DILL, K.; PANGILINAN, E.; WAKENIGHT, P.; TESSIER-LAVIGNE, M. & SKAMES, W.C. 2001. Functional Analyses of Secreted and Transmembrane Proteins Critical to Mouse Development. *Nature Genetics* 28: 241-249.
- [10] GOLDSMITH, A.P.; GOSSAGE, S.J. & FRENCH-CONSTANT, C. 2004. ADAM23 is a Cell-Surface Glycoprotein Expressed by Central Nervous System Neurons. *Journal of Neuroscience Research* 78: 647-658.
- [11] FAMBROUGH, D.; PAN, D.; RUBIN, G. M.; GOODAN, G. S. 1996. The Cell Surface Metalloprotease/ Disintegrin Kuzbanian is Required for Axonal Extension in *Drosophila*. *Neurobiology* 93: 13233 - 13238.
- [12] HALL, R. J.; ERICKSON, C. A. 2003. ADAM10: An Active Metalloprotease Expressed During Avian Epithelial Morphogenesis. *Developmental Biology* 256: 146-159.
- [13] GILPIN, B. J.; LOECHEL, F.; MATTEI, M. G.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U. M. 1998. A Novel, Secreted Form of Human ADAM12 (Meltrina α) Provokes Myogenesis in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 157-166.
- [14] ZHANG, X. -P.; KAMATA, T.; YOKOYAMA, K.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; TAKADA, Y. 1998. Specific Interaction of the Recombinant Disintegrin-like Domain of MDC-15 (Metargidin, ADAM-15) With Integrin $\alpha_5\beta_3$. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 7345-7350.
- [15] CERRETTI, D. P.; DUBOSE, R. F.; BLACK, R. A.; NELSON, N. 1999. Isolation of Two Novel Metalloproteinase-Disintegrin (ADAM) cDNAs That Show Testis-Specific Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263: 810-815.
- [16] WESKAMP, G.; CAI, H.; BRODIE, T. A.; HIGASHYAMA, S.; MANOVA, K.; LUDWIG, T.; BLOBEL, C. P. 2002. Mice Lacking the Metalloprotease-Disintegrin MDC9 (ADAM0) Have no Evident Major Abnormalities During Developmental or Adult Life. *Molecular and Cellular Biology* 22: 1537-1544.
- [17] CHOI, I.; WOO, J.-M.; HONG, S.; JUNG, Y. -K.; KIM, D.H.; CHO, C. 2003. Identification and Characterization of ADAM32 With Testis-Predominant Gene Expression. *Gene: An International Journal on Genes and Genomes* 304: 151-162.
- [18] YUAN, R.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. 1997. A Role for the Disintegrin Domain of Cyritestin, a Sperm Surface Protein Belonging to the ADAM Family, in Mouse Sperm-Egg Plasma Membrane Adhesion and Fusion. *The Journal of Cell Biology* 137: 105-112.
- [19] SUN, Y.P.; DENG, K. J.; WANG, F.; ZHANG, J.; HUANG, X.; QIAO, S.; ZHAO, S. 2004. Two Novel Isoforms of ADAM23 Expressed in the Developmental Process of Mouse and Human Brains. *Gene: An International Journal on Genes and Genome* 325: 171-178.

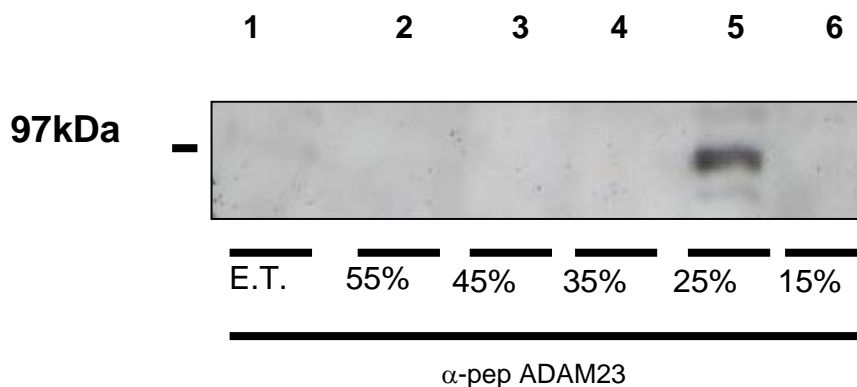


Figura 1. ADAM23 presente de forma significativa na fração 25% de amostras protéicas cerebrais de animais adultos (100µg/ por canaleta) obtidas por precipitação seqüencial com sulfato de amônio saturado. As proteínas de diferentes amostras (55%, 45%, 35%, 25% e 15%) foram resolvidas eletroforéticamente (100µg/ por canaleta) em gel de poliacrilamida à 6%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida a reação de Western Blotting. A parca reação do anticorpo α -pep ADAM23 sobre a mesma quantidade de extrato total bruto (100µg) evidencia o sucesso deste método no enriquecimento do antígeno de interesse na fração 25%.

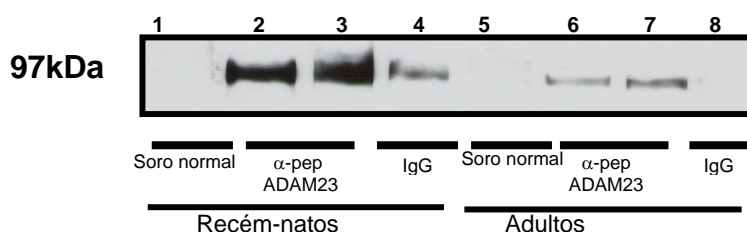


Figura 2. Expressão acentuada de ADAM23 no sistema nervoso ainda imaturo de camundongos Swiss. Proteínas da preparação de membrana de cérebros de camundongos recém-natos (canaletas 1-4) e adultos (canaletas 5-8) foram resolvidas (600µg/ canaleta) eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 6%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida a reação de Western Blotting. Pode ser observado que o anticorpo anti-peptídeo reconhece fortemente o antígeno de 92 kDa presente em ambos os tecidos, contudo sua expressão é reduzida no cérebro adulto e altamente expressa em animais com 6 dias de desenvolvimento pós-natal (comparar canaletas 2-4 com 6-8).